

Thesis

GIESSEN

1966

Aus dem Hygiene-Institut
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg
Direktor: Professor Dr. R. Haas
und dem
Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

Untersuchungen über Poliovirusinhibitoren in Rinderseren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Hermann Gonçalves|Schatzmayr
Tierarzt aus Rio de Janeiro/Brasilien

Gießen 1966

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus dem Hygiene-Institut
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg
Direktor: Professor Dr. R. Haas
und dem
Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

Untersuchungen über Poliovirusinhibitoren in Rinderseren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Hermann Gonçalves Schatzmayr
Tierarzt aus Rio de Janeiro / Brasilien

Gießen 1966

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Prof. Dr. H. Bartels

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
III. Versuche	
1. Grundphänomen	13
2. Verhalten von Rinderseren	14
3. Vergleichende Untersuchungen der inhibitorischen Aktivität im Neutra- lisationstest und im Gel-Adsorptions- test	16
4. Charakterisierung des Inhibitors	20
5. Untersuchungen über die Bindung zwischen Virus und Inhibitor	24
6. Unterschiedliche Spezifität von Rinderseruminhibitoren	28
IV. Besprechung der Ergebnisse	31
V. Zusammenfassung	41
VI. Literaturverzeichnis	42



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Die hemmende Wirkung von normalen Tierseren auf die Vermehrung von Viren und ihr störender Einfluss bei serologischen Untersuchungen, insbesondere bei der Hämagglutinationshemmreaktion, sind seit langem bekannt. Die Natur der in den Seren vorhandenen Hemmstoffe ist sehr verschieden. Man teilt sie meistens ein nach Art der Viren, gegen die sie wirksam sind, nach der Art des durch sie gehemmten biologischen Vorganges, sei es der Vermehrung von Viren, sei es der Hämagglutination und schliesslich auch nach stofflichen Kriterien. Gerade die stoffliche Charakterisierung ist noch unvollkommen. Anfänglich war es meist erforderlich zu beweisen, daß die inhibitorisch wirksamen Aktivitäten sich von erworbenen Immunantikörpern unterscheiden. Erste Anhaltspunkte über derartige Unterschiede gewann man aus Untersuchungen über die Inaktivierbarkeit der inhibitorischen Wirkung durch Erhitzung auf 56°C. Jedoch liess sich sehr oft zeigen, insbesondere nach Anwendung weiterer differenzierender Methoden, dass es neben hitzesensiblen, auch hitzeresistente Inhibitoren gibt, die sich in verschiedenen Seren nachweisen lassen. Schliesslich läßt sich mancher Inhibitor durch stoffliche Charakterisierung nicht von Immunglobulinen d.h. von Antikörpern unterscheiden. Es bietet sich heute ein vielfältiges Bild verschiedenartiger und in verschiedener Hinsicht bei Viren wirksamer Inhibitoren, von den besonders gut die Stoffe untersucht worden sind, die die Hämagglutination von Myxoviren zu hemmen vermögen. Weniger bekannt und untersucht sind in tierischen Seren nachweisbare Hemmstoffe der Vermehrung von Enteroviren, insbesondere der Vermehrung von Polioviren. Die folgende Untersuchung befasst sich ausschliesslich mit solchen in tierischen Seren nachweisbaren, gegen Enteroviren wirksame Inhibitoren, und zwar aus folgendem Anlass:

Vor allem in Rinder-, aber auch in Pferdeseren, liessen sich Stoffe nachweisen (siehe unten), die die Vermehrung von Polioviren zu hemmen vermögen. Die bislang in der Literatur auffindbare Charakterisierung dieser Stoffe rückt sie in die Gruppe der Immunglobuline, m.a.W. es könnte sich um Antikörper handeln. Sie unterscheiden sich aber in charakteristischer Weise von den gegen die drei Poliovirusserotypenantigene gerichteten neutralisierenden Antikörpern. Es gibt zum gleichen Serotyp gehörige Virusstämme, die gegen die inhibitorische Wirkung eines bestimm-

ten Rinderserums resistent sind, sei es als natürlich aufgefundenen Virusstämme, sei es als in Gegenwart des inhibierenden Serums selektierte Mutanten. Mutanten, die gegen die Wirkung eines neutralisierenden typenspezifischen Antiserums resistent sind, hat man bislang nicht selektieren können. Ausserdem aber konnte man zeigen, daß es Virusstämme gleichen Serotyps gibt, gegen die mehrere Inhibitoren mit verschiedener Spezifität wirksam sind, indem sich resistente Mutanten gegen ein Serum selektieren liessen, die gegen die Hemmwirkung anderer Seren weiterhin empfindlich waren. Es lassen sich somit den Virusstämmen eines Serotyps Inhibitoren mit verschiedener Spezifität zuordnen. Unklar ist bisher, ob es dabei Inhibitoren mit einer den Serotyp übergreifenden Spezifität, m.a.W., ob es an Virusstämmen verschiedenen Serotyps Bindungsstellen für den gleichen Inhibitor gibt. Diese Betrachtung zeigt, daß die Untersuchung von derartigen Inhibitoren eventuell zu einem System von Eigenschaften des Polioviruskapsids führen könnte, anhand dessen man die Identifizierung eines Stammes, sei es im Sinne der Kauffmann-White Klassifizierung von Salmonellen, sei es im Interesse genetischer Untersuchungen, sei es auch einfach im Interesse der Aufklärung der funktionellen und strukturellen Gliederung des Polioviruskapsids, vornehmen könnte.

Die vorliegende Untersuchung hat sich zur Aufgabe gesetzt, die Wechselwirkung zwischen den stammspezifisch wirksamen Rinder-seruminhibitoren und Polioviren in-vitro in einem zellfreien System zu untersuchen, um bei einer späteren Analyse der spezifischen Bindungsstellen des Polioviruskapsids für Rinderseruminhibitoren ein Reaktionssystem zu besitzen, daß von Faktoren der Wirtszelle bei Neutralisationsversuchen nicht verfälscht wird. Es soll ausserdem versucht werden, die Inhibitoren noch klarer als bisher geschehen, stofflich zu charakterisieren und ihre Bindung an das Poliovirus mit der Bindung vom Immunantikörper zu vergleichen.

Um die Ausgangsposition der Arbeit darzulegen, wird im folgenden ein kurzer Literaturüberblick gegeben.

Flexner und Lewis (1) wiesen im Verlaufe ihrer Versuche zur Serumtherapie der Poliomyelitis - die Übertragbarkeit der Erkrankung war ein Jahr vorher von Landsteiner und Popper erstmals bewiesen worden - schon im Jahre 1910 nach, daß im Serum von normalen Schafen hitzebeständige (56°C, 30') Aktivitäten nachweisbar sind, die antikörperartig die Infektiosität von poliovirus-

infiziertem Rückenmark von Rhesusaffen herabzusetzen vermochten. Weitere Untersuchungen wurden erst wieder durchgeführt, als es gelungen war, das Poliovirus an Labortieren, Ratten und Mäusen, zu adaptieren (2). Hammon et al. (3) untersuchten Seren von Wild- und Haustieren auf neutralisierende Aktivitäten gegen den Stamm Lansing und fanden bei Haustieren höhere Titer. Sabin und Fieldsteel (4) wiesen im Kolostrum und im Serum von Rindern vermehrungshemmende Stoffe gegen den Stamm Lansing nach. Bartell und Klein (5) und McFerran (6) fanden in Rinderseren erwachsener Tiere inhibitorische Stoffe gegen alle drei Poliovirustypen. Bei den ersten Studien über die Vermehrung des Poliovirus in Gewebekulturen (7) fand man eine inhibitorische Wirkung von Pferdeserum, das dem Medium als zellwachstumstimulierend zugesetzt worden war. Ähnliche Stoffe findet man bei Kaninchen (18, 22). Umgekehrt konnte man in menschlichen Seren inhibitorisch wirksame Substanzen gegen bovine Enteroviren nachweisen, wobei in diesem Zusammenhang nur solche gemeint sind, die die Vermehrung von Enteroviren hemmen, nicht solche, die die bei manchen Enteroviren vorhandene hämagglutinatorische Wirkung zu hemmen vermögen.

Einige Eigenschaften lassen vermuten, daß es sich bei den genannten Inhibitoren in Rinder- und Pferdeseren um Antikörper handeln könnte:

1. Sie werden von den Tieren erst erworben. Bei manchen Tieren, insbesondere jungen Tieren sind sie nicht nachweisbar (6).
2. Sie sind z.T. typenspezifisch wirksam (5, 6).
3. Sie werden mit halbgesättigtem Ammonsulfat gefällt, verhalten sich also wie Globuline. Sie erscheinen bei Filtration mit Sephadex G-200 in der Makroglobulinfraktion (9).
4. Die bei einzelnen Tieren nachweisbaren Serumtiter sind unterschiedlich hoch und werden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung erworben.
5. Untersuchungen über die Neutralisationskinetik in-vitro lassen den Schluss zu, daß es in Abwesenheit von Zellen zu einer Bindung der inhibitorisch wirksamen Substanzen an das Virus kommt (10). Takemoto et al. (11) konnten bei Pferdeseren eine solche Wirkung in-vitro nicht nachweisen, später wurde sie jedoch auch beschrieben (12).

Schwierig ist die Erklärung ihrer Entstehung. Man hat verschiedentlich Tiere mit infektiösem Poliovirus zu immunisieren versucht, (4, 13) jedoch ohne Erfolg. Ein Befund von Koprowski, der Poliovirus aus dem Stuhl eines Kalbes isolierte und einen Anstieg neutralisierender Antikörper im Serum nachwies, blieb singulär (siehe McFerran et al. (14)). Ein Unterschied zu typenspezifischen neutralisierenden Antikörpern ergibt sich auch aus folgenden Befunden:

Nachdem die Plaquetechnik von Dulbecco und Vogt (15) entwickelt worden war, untersuchten Takemori et al. (10) die Plaquebildung von Poliovirus Typ 1 und 2 in Gegenwart von Agar, der inhibitorisches Rinderserum enthielt. Die entstehenden Plaques waren kleiner und auch weniger zahlreich als in

der Kontrolle. Einige Plaques waren normal groß. Aus Abimpfungen dieser grossen Plaques erhielt man Virusstämme, die nicht mehr empfindlich gegen das Rinderserum waren. Hirst (16) gelang es durch Rekombinationsversuche Doppelmutante zu züchten, die gleichzeitig gegen ein Pferde- und gegen ein Rinderserum resistent waren. Ledinko (17) erhielt Doppelmutanten, die gegen die Hemmwirkung eines Pferdeserums und von Guanidin resistent waren. Pagano und Böttiger (18) konnten ein inhibitorisches Rinderserum beschreiben, das gegen den attenuierten Stamm CHAT (Poliovirus Typ 1) und seine Nachkommenschaft aus Stuhlmaterial menschlicher Impflinge wirksam war. In weiteren Untersuchungen konnten Pagano et al (9) resistente Mutanten des Stammes CHAT beschreiben. Resistenz eines Virusstammes gegen einen typenspezifischen Antikörper ist bislang nicht beschrieben worden.

II. Material und Methoden

1. Herstellung von Gewebekulturen

Röhrchen- und Vierkantflaschengewebekulturen (Schott und Gen., Mainz) von Rhesusaffennierenzellen wurden nach Youngner (19) hergestellt.

2. Lösungen

a) Gewebekulturnährmedium: Bei der Anzüchtung der Gewebekulturen wurde 0,5%iges Lactalbuminhydrolysat (Biochemical Corporation) in Hankssalzlösung mit 5%igem Kälberserum, Natriumbikarbonat und Antibiotika verwendet. Bei der Vermehrung der Viren enthält das Medium, wenn nicht anders erwähnt, kein Serum (LAH Medium).

b) Pufferlösungen: Für das Adsorptionsverfahren an Aluminiumhydroxyd-Gel wurde ein Spezialpuffer verwendet, der aus einem Sörensen-Phosphatpuffer mit einem Zusatz von 0,1 M Tris · HCl, pH 7,5, besteht. Die Molarität der Phosphatpuffer wurde variiert (=Phosphat/Trispuffer). Für die Virus- und Serumverdünnungen wurde ein Puffer aus gleichen Teilen von Hankslösung und Tris · HCl-Puffer, 0,1 M, pH 7,5 verwendet (Hanks/Tris-Puffer).

3. Virusstämme

Poliovirus Typ 1, Stämme Mahoney und CHAT. Stamm CHAT ist ein attenuiertes Virus, das bei der oralen Schutzimpfung gegen die spinale Kinderlähmung benutzt wird.

4. Züchtung von inhibitorresistenten Virusstämmen

Stamm Mahoney ist sensibel für die inhibitorische Wirkung von Rinder Serum Nr. 8 (RS8). Stamm CHAT ist sensibel für die inhibitorische Wirkung des Rinder Serums Nr. 12. Aus beiden wurden Varianten isoliert, die gegen die inhibitorische Wirkung in den betreffenden Seren resistent sind. Sie wurden auf folgende Weise selektiert:

Die empfindlichen Stämme wurden in Gegenwart des entsprechenden inhibitorischen Rinder Serums mehrmals in Affen-nierenzellen vermehrt. Nach etwa 10 - 15 Passagen wurde die Empfindlichkeit der Stämme im Neutralisationstest (Kinetik) bestimmt (siehe unten). Wenn sich die untersuchte Viruspopulation einer Passage nur noch wenig empfindlich gegen die Wirkung des inhibitorischen Serums zeigte, wurde die Selektion im Aluminiumhydroxyd-Gel System in-vitro fortgesetzt. Die schliesslich in die Untersuchung genommenen resistenten Mu-

tanten sind Nachkommenschaft aus einzelnen Plaques. Sie wurden in Abwesenheit von Serum vermehrt.

5. ^{32}P -Markierung der Virusstämme

Ausgewachsene Zellrasen werden mit phosphatfreier Salzlösung nach Hanks fünf mal gewaschen und mit 10^7 TCD₅₀ pro Rouxschale beimpft. Nach einer Stunde bei 37°C werden 40 ml TCM 199 Medium ohne Phosphat (Behringwerke), welches 4-5 mC ^{32}P -Orthophosphat (Kernreaktor Karlsruhe) enthält, dazu gegeben. Die Flaschen werden dann weiter bebrütet bis der Zellrasen infolge der Virusvermehrung völlig zerstört ist. Nach Einfrieren und Auftauen wird der Zelldetritus bei 15.000 U.p.M. und bei 4°C 20 Minuten lang zentrifugiert. Zu dem Überstand wird Aluminiumhydroxid-Gel bis zu einer Endkonzentration von 1,0 mg Al₂ O₃/ml gegeben. Dabei soll der pH-Wert des Gemisches zwischen 7,5 und 5,5 liegen. Die Mischung wird bei Zimmertemperatur 10 Minuten lang geschüttelt, dann wird nach Zentrifugierung (2 Minuten bei 1 600 g) das Sediment dreimal mit Phosphatpuffer 0,05 M, pH 5,5 gewaschen. Anschliessend wird das Virus mit 0,4 M Phosphatpuffer, pH 7,5, 15 Minuten lang eluiert. Im Eluat befinden sich 2-3% der primären Radioaktivität und 70-80% der Infektivität. Die weitere Reinigung wird nach Angaben von Levintow und Darnell (20) auf Ecteolazellulose durchgeführt (Ecteolazellulose, Fa. Serva, Heidelberg). Es wird zunächst das Eluat von Al.hydr. gegen Hankslösung (in doppelt destilliertem Wasser 1/1) über Nacht dialysiert. 6 ml des Eluates werden auf eine 6 ml Ecteolasäule gegeben und anschliessend mit 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,2 eluiert. Das Virus erscheint im Eluat in einer einzigen homogenen Fraktion, während ^{32}P -haltige, nicht am Virus gebun-

dene Fraktionen erst nach Zugabe von NaCl oder bei höheren Phosphatkonzentrationen erscheinen. Die Ausbeute des gesamten Reinigungsverfahrens beträgt 60 - 70 %.

Die Brauchbarkeit ^{32}P -markierter Poliomyelitisviruspräparate wird auf folgende Weise geprüft: 1 ml des Virusmaterials wird mit Hanks/Trispuffer verdünnt und mit 1 ml homologen typenspezifischen Kaninchenantiserum gemischt und zwar in einer Verdünnung, die einem Antikörperüberschuß entspricht. Die Mischung wird bei 37°C zwei Stunden lang inkubiert und zusätzlich werden 2 ml Phosphatpuffer 0,04 M, pH 7.5 und 1 ml Aluminiumhydroxyd-Gel dazugegeben, entsprechend einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml Al_2O_3 . Nach 15 Minuten langer Adsorption bei Zimmertemperatur wird bei 1600 g 5 Minuten lang abzentrifugiert. Die Radioaktivität des Überstandes wird dann gemessen und das Eluat des Virus-Antiserum-Gemisches soll weniger als 5-10 % der Kontrolle (anstatt Antiserum Hankslösung, bei sonst gleicher Behandlung) sein, d.h. mehr als 90 % der Radioaktivität sind virusspezifisch gebunden (21).

6. Seren

Rinderseren erwachsener Tiere wurden vom Schlachthof bezogen. Kaninchen-19 S-Immunantikörper gegen Poliovirus wurden nach Angaben von Svehac (22) gewonnen und vor Verwendung auf Empfindlichkeit gegen 2-Mercapto-Äthanol geprüft.

7 S-Immunantikörper wurden gleichfalls von Kaninchen, die mit hochtitriger Virussuspension i.m. und i.v. immunisiert wurden, gewonnen und vor Verwendung in den Versuchen an DEAE-

Zellulose (23) fraktioniert. Rinderglobulin präzipitierende Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit ca. 20 ml Rinderglobulin gewonnen, das keine inhibitorische Wirkung gegen die beiden Poliovirusstämme CHAT und Mahoney besitzt.

7. Neutralisationskinetik

Der Neutralisationskinetiktest wurde nach der Methode von Dulbecco et al. (24) durchgeführt. Der Titer wurde in pfu/ml ausgedrückt.

8. Titration der Seren in Gewebekulturen

Die inhibitorische Aktivität kann in Gewebekulturen nicht nur durch Untersuchung der Neutralisationskinetik im Plaquetest, sondern auch im Röhrchentest bestimmt werden (Immuninaktivierung nach Gard (25)). Der Titer kann in diesem Fall als eine Verdünnung, in welcher 50% der beimpften Röhrchen einen zytopathologischen Effekt gegen 10 - 50 TCID₅₀ Virus zeigen, definiert werden. Diese Methode gibt wenig genaue Werte, weil nach dem 4. Tag der Inkubation eine hohe Fraktion nicht neutralisierter Virusteilchen durchkommt.

9. DEAE-Zellulose

Die Seren wurden gegen einen 0,02 M Phosphatpuffer, pH 8,0, über Nacht dialysiert. Die Säule (10 cm hoch, 1 cm Durchmesser) wurde mit dem gleichen Puffer gründlich gewaschen bis der gleiche pH-Wert erreicht wurde. Nach Zugabe von 2 ml Serum wurden Eluate durch Addition weiterer 2 ml Pufferfraktionen von zunehmender Molarität und abnehmendem

pH-Wert gewonnen, Jede Säule ergibt ungefähr 40 Fraktionen, in welchen die gesamte optische Dichte feststellbar ist. Die Messungen wurden in einem Zeiss-Photometer (PMQ II) bei einer Wellenlänge von 280 m μ vorgenommen. Von jeder Fraktion wurde zusätzlich die inhibitorische Aktivität, in Gewebekulturen und im Adsorptionstest, gemessen.

10. Sephadex G-200

15 g des Produktes wurden in ca. 1 Liter Puffer (0,1 M NaCl und 0,1 M Trispuffer, pH 8,0) aufgelöst und sorgfältig mit demselben Puffer in einer Glassäule (5 x 40 cm) gewaschen. 5 ml des gegen den gleichen Puffer dialysierten Serums wurden dazu gegeben und anschliessend 5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden wie in der vorhergehend beschriebenen Methode weiter untersucht.

11. Saccharosegradient

Saccharoselösungen von 40 %, 32 %, 24 %, 16 % und 10 % (g/vol.) in bidest. Wasser wurden in Zentrifugenröhrchen zu je 0,8 ml übereinander geschichtet. Nach Aufbewahrung über Nacht bei 4°C wurden vorsichtig 0,5 ml Vollserum und Bayol 55 (Esso Co.) überschichtet. Die Röhrchen wurden in einer Spinco L-Zentrifuge (Beckman-Instruments, Rotor SW 39) 8 Stunden lang bei 38.000 U.p.M. zentrifugiert. Die Fraktionen wurden durch Anstechen des Röhrchenbodens mit einer Kanüle ~~16~~ 16 gewonnen. Jede Probe (6 Tropfen) wurde in 0,2 ml Wasser aufgenommen und weiter auf optische Dichte und inhibitorische Stoffe hin untersucht.

12. Behandlung mit 2-Mercapto-Äthanol

Die im Serum vorhandenen inhibitorischen Stoffe wurden nach Svebag (22) getestet. Die Seren wurden 24 Stunden lang in Gegenwart von 2-Mercapto-Äthanol (Endkonzentration 0,2 M) bei 4°C aufbewahrt. Die Wirkung von 2-Mercapto-Äthanol wurde im Aluminiumhydroxyd-Gel System mit markiertem ^{32}P -Virus untersucht, wie in Abschnitt III 4 beschrieben wird.

13. Geladsorptionstechnik

Um die Gegenwart und die Aktivität von Kaninchen-Immunkörpern oder Rinderseruminhibitor in-vitro zu prüfen, wurde die Geladsorptionsmethode angewendet (26).

a) Charakterisierung der Virus-Inhibitor-Komplexe.

0,5 ml von ^{32}P -markiertem Poliovirus (ca. 10.000 Imp/Min.) werden mit gleichem Volumen einer Serumverdünnung, die einen Überschuss an Antikörpern oder Inhibitor enthält, bei 37°C, 120 Minuten lang inkubiert, 12 ml Hanks/Trispuffer werden dann zugesetzt und die Mischung wird auf 5 Zentrifugenröhrchen, je 2 ml verteilt. 2 ml Phosphat/Trispuffer verschiedener Konzentration werden hinzugefügt, ferner 1 ml Aluminiumhydroxyd-Gel (Endkonzentration in jedem Röhrchen 0,6 mg/ml). Die Mischungen werden bei Zimmertemperatur 15 Minuten lang aufbewahrt und anschliessend bei 3.000 U.p.M. zentrifugiert. In den Überständen wird die ^{32}P -Aktivität gemessen. Als 100 % Wert wird die Virusaktivität in einer Kontrolle bei 0,16 M Phosphat Endkonzentration, pH 7,5 genommen.

b) Titration eines Serums im Aluminiumhydroxyd-Gel System.

Die Methode erlaubt auch eine Titration des Anti-

körper- oder Inhibitorengehaltes. 0,02 ml ^{32}P -markiertes Virus werden mit 0,2 ml jeder Serumverdünnung (Faktor 4) gemischt und bei 37°C , 120 Minuten lang inkubiert. Als Kontrolle wird anstelle des aktiven Serums Kälberserum genommen. Anschliessend werden 1,6 ml Hanks/Trispuffer, 2,0 ml Phosphat/Trispuffer, 0,04 M und 1 ml Al.hydr.-Gel zugesetzt. Die Aktivität des Eluates in der Kontrolle wird als 100% Wert angesehen. Der Titer entspricht einer Serumverdünnung, bei der 50% der Aktivität der Kontrolle erreicht wird.

14. Aluminiumhydroxyd-Gel

Bei den angewandten Konzentrationen ist das Aluminiumhydroxyd-Gel stabil und adsorbiert zwischen pH 5,0 und 9,0 im Bereich unterhalb von 0,005 M Phosphat das Poliovirus fast vollständig.

15. Absorptionsverfahren

Die Absorption der inhibitorischen Aktivität eines Serums wurde mit nicht-markiertem nativem Virus durchgeführt. Die Restaktivität des adsorbierten Rinderserums wurde, wie oben beschrieben, mit ^{32}P -markiertem Indikatorvirus getestet.

16. Präzipitationsversuche

Die Präzipitationsversuche wurden nach der Methode von Gerloff et al. (27) mit resistenten und empfindlichen ^{32}P -markierten Poliovirusstämmen durchgeführt.

Inhibitorisches Rinderserum (RS 8) 1 ml (1/2 verdünnt) wurde mit 1 ml ^{32}P -markiertem Poliovirus (bo^+) gemischt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Mischung wurde in

gleiche Portionen (je 0,8 ml) geteilt. Ein Röhrchen davon erhielt zusätzlich 0,8 ml Kälberserum unverdünnt und das andere 0,8 ml unverdünntes präzipitierendes Anti-Rinderglobulin Kaninchenserum. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C, wurden alle Röhrchen bei 15.000 U.p.M. und 4°C zentrifugiert und die Aktivität im Überstand gemessen. Als Kontrollen wurden anfänglich Mischungen des gleichen Virus mit Kälberserum sowie eines ^{32}P -markierten Virusresistenten (bo_8) mit Rinderserum Nr. 8 oder Kälberserum eingesetzt und auf gleiche Art behandelt.

17. pH-Dissoziation

Die pH-Dissoziation von Virus-Antikörpern oder Virus-Inhibitor-Komplexen wurde grundsätzlich nach der Angabe von Mandel (28) durchgeführt. Die Mischungen wurden auf einen sauren pH-Wert eingestellt und bei Zimmertemperatur, 30 Minuten lang aufbewahrt. Der pH wurde dann in den neutralen Bereich durch Tris.HCl Puffer verschoben. Die Dissoziationsprodukte wurden durch den Zusatz von Phosphat/Trispuffer und Al.hydr.-Gel im Gel-Adsorptionssystem untersucht.

18. Bestimmung der ^{32}P -Radioaktivität

Die Messung von ^{32}P -Radioaktivität wurde mit einem Methandurchflusszählrohr (Fa. Friessecke u. Hoepfner FH 407) in Verbindung mit einem automatischen Probewechser und einem Zählgerät FH 49 durchgeführt. Die Proben wurden auf Schälchen pipettiert und in Heissluftsterilisator nach Zusatz eines Tropfens Detergens (Arlacel A, Fa. Serva, Heidelberg) eingetrocknet. In der Regel sind mindestens 1000 Impulse gezählt worden.

III. Versuche

1. Grundphänomen

Markiertes ^{32}P -Poliovirus (Mahoney) wird mit einem Überschuss von 19S- und 7S-Immunantikörpern von Kaninchen und in einer Kontrolle mit Kälberserum inkubiert und danach am Aluminiumhydroxyd-Gel chromatographiert.

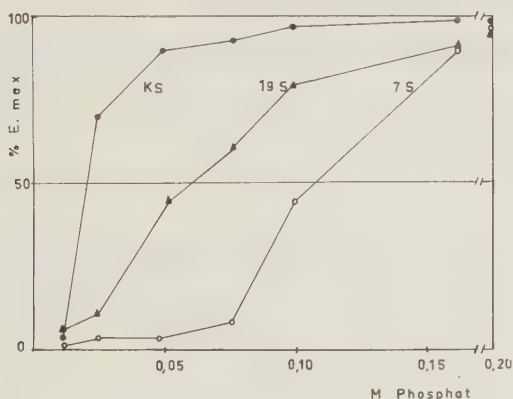


Abb. 1: Elutionskurven von Komplexen aus ^{32}P -Poliovirus Stamm Mahoney mit typenspezifischen 7S (○—○) und 19S (▲—▲) Immunantikörpern von Kaninchen. Kontrolle: Verhalten des Virus nach Inkubation mit Inhibitor-freiem Kälberserum (●—●).

Die eingetragenen Phosphatwerte entsprechen den Endkonzentrationen im Überstand nach Zentrifugierung des Al.hydr.-Gels. 100% Elutionswert: Aktivität im Überstand der Virus-Kälberserummischung bei 0,2 M Phosphat.

Während das mit Kälberserum inkubierte Virus nur schwach an das Adsorbens gebunden wird, werden Komplexe aus Virus mit

19 S oder 7 S-Antikörpern unterschiedlich fest an das Adsorbens gebunden, Virus-7 S Antikörper Komplexe fester als die aus Virus und 19 S Antikörpern. Die Lage der Elutionskurven ist bei Verwendung des gleichen Serums ziemlich konstant, sie variiert bei Verwendung anderer Seren um ca. $\pm 10\%$ des 50%-Phosphatwertes der Elution. Es lässt sich ferner zeigen, daß nicht freies Virus, sondern Virus-Antikörper Komplexe von dem Adsorbens eluiert werden.

2. Verhalten von Rinderseren

Verschiedene Rinderseren, nach Inaktivierung bei 56°C , 30 Minuten lang, wurden dann auf gleiche Art in dem beschriebenen Testsystem untersucht.

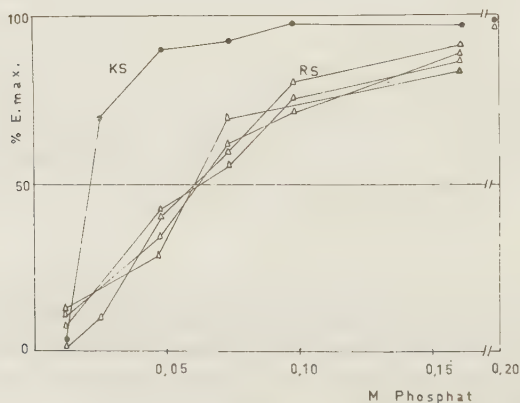


Abb. 2: Elutionskurven von ^{32}P -markiertem Virus Mahoney, das mit verschiedenen Rinderseren ($\triangle$ — $\triangle$) inkubiert wurde, im Vergleich mit Virus-Kälberserum Gemischen ($\bullet$ — $\bullet$).

In einigen Seren, wie in Abbildung 2 angegeben, waren Stoffe nachweisbar, die zu einer festeren Bindung des Virus an das Adsorbens führten. Die Lage der Elutionskurven entspricht dabei ungefähr der Lage der Elutionskurven von Virus-19 S Antikörper Komplexen. Eine Verschiebung nach höheren Werten als ca 0,06 M Phosphat (= 50% Elution) wurde nicht beobachtet, auch dann nicht, wenn nach einstündiger Inkubation des Virus-Serum Gemisches bei 37°C frisches Serum zugesetzt und noch einmal inkubiert wurde. Zwischen den einzelnen Rinderseren lassen sich geringfügige Unterschiede in der Lage der Elutionskurven feststellen.

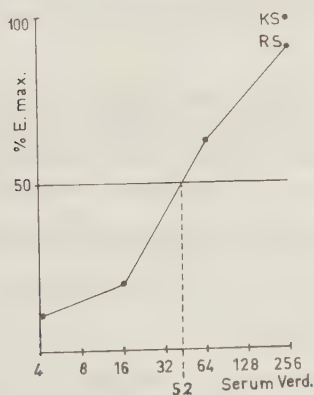


Abb. 3: Titration eines inhibitorischen Rinderserums im Al. hydr.-Gel System. Phosphatendkonzentration = 0,016 M. 100% Wert = Elutionswert einer Mischung von Virus-Kälberserum. Die Serumverdünnung 1/52 entspricht einer CIE (chromatographische Inhibitorereinheit).

Die in den Rinderseren vorhandene Aktivität, die das chromatographische Verhalten des Poliovirus Typ 1, Stamm

Mahoney, verändert, kann im gleichen Gel-Adsorptionssystem auch titriert werden, indem die Elutionen in parallelen Röhrchen bei gleicher Phosphatkonzentration an Virus-Serumgemischen durchgeführt werden, in denen das Serum abgestuft verdünnt wurde. Die Lage der Elutionskurven ist nämlich von der Serumverdünnung abhängig. Als Titer des Serums wird jene Serumverdünnung angegeben, bei der eine Elution von 50% der Kontrolle erfolgt. In dieser Verdünnung enthält das Serum dann definitionsgemäß eine chromatographische Inhibitoreinheit (CIE)/ml.

3. Vergleichende Untersuchung der inhibitorischen Aktivität im Neutralisationstest und im Gel-Adsorptionstest

Es muß zunächst bewiesen werden, daß die im Gel-Adsorptionstest nachweisbare Aktivität, die zur festeren Bindung des Virus an das Adsorbens führt, von der gleichen Aktivität bewirkt wird, die im Neutralisationstest die Virusvermehrung hemmt.

a) Korrelation der Titer

20 verschiedene individuelle Rinderseren wurden im Neutralisationstest (Röhrchentest in Affennierenzellen) und gleichzeitig im Gel-Adsorptionstest auf die betreffenden Aktivitäten titriert. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt. In Anbetracht der relativ breiten Streuung des biologischen Testes und der Schwierigkeit der Ablesung wegen Infektiositätsdurchbruches am 4. Tag ergibt sich eine gute Korrelation der nach beiden Verfahren bestimmten Titer. Dies ist als ein

erster Hinweis zu werten, daß die in-vitro bestimmte Aktivität der Inhibitor selbst ist.

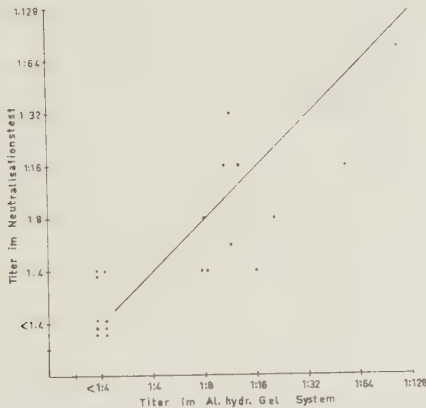


Abb. 4: Titration von 20 Rinderseren im Neutralisationstest in Affennierengewebekulturen (Röhrchentest; Ablesung 4. Tag) und parallel dazu im Gel-Adsorptionstest gegen Poliovirus Typ 1, Mahoney.

b) Chromatographiert man ein inhibitorhaltiges Rinderserum an DEAE-Zellulose und untersucht die Aktivitäten wiederum im Neutralisationstest und im Gel-Adsorptionstest, so zeigt sich, Abbildung 5, daß in der 7 S Fraktion des Serums keine Aktivität nachweisbar ist, wohl dagegen in späteren Fraktionen, die dem Verhalten von Makroglobulinen entsprechen. In dem vorliegenden Zusammenhang kommt es jedoch lediglich darauf an, daß die in beiden Verfahren gemessenen Aktivitäten sich in den gleichen Fraktionen verteilen, ein sehr sicheres weiteres Indiz, daß mit beiden Verfahren die gleichen Stoffe gemessen werden.

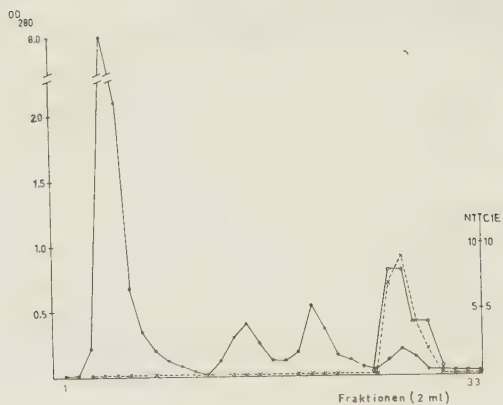


Abb. 5: Trennung eines inhibitorhaltigen Rinderserums an DEAE-Zellulose. Die Linie (●—●) zeigt die optische Dichte bei 280 mμ an. Die Titer verschiedener Fraktionen wurden durch das Al.hydr.-Gel System (x----x) und im Neutralisationstest in Affennierenröhrchenkulturen (o—o) bestimmt. Die mit den beiden Verfahren gemessenen Aktivitäten lagen in den gleichen Fraktionen.

c) Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, wird durch Rinderserum Nr. 8 neutralisiert, eine gegen dieses Serum selektierte Mutante bo_8 dagegen nicht. Dies geht aus Abbildung 6 a hervor, in der die Neutralisationskinetik beider Stämme dargestellt ist. Stamm Mahoney bo^+ wird durch Rinderserum Nr. 8 um etwa $1 \log_{10}$ inaktiviert. (Der Charakter des nicht inaktivierten Restvirus wird weiter unten erörtert). Im Gemisch mit Kälberserum wird das gleiche Virus dagegen nur geringfügig im Titer gesenkt. Stamm bo_8 wird jedoch weder durch Kälberserum noch durch Rinderserum Nr. 8 inaktiviert.

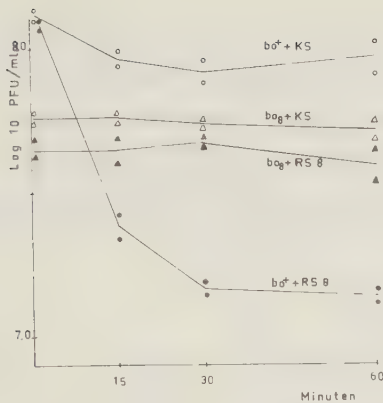


Abb. 6a: Neutralisationskinetik von Mahoney empfindlichen (bo') und Mahoney resistenten (bo_8) Stämmen gegen dasselbe Rinderserum (RS8). Das Rinderserum wirkt auf den empfindlichen Stamm und die nicht neutralisierbare Fraktion ist gut erkennbar. Der resistente Stamm wird von dem Serum nicht angegriffen.

Untersucht man beide Virusstämme nach radioaktiver Markierung im in-vitro Test (Abb. 6b), so ergibt sich das grundsätzlich gleiche Verhalten. Das resistente Virus bo_8 verhält sich chromatographisch nach Inkubation mit Rinder-serum Nr. 8 wie nach Inkubation mit Kälberserum oder wie Stamm Mahoney nach Inkubation mit Kälberserum.

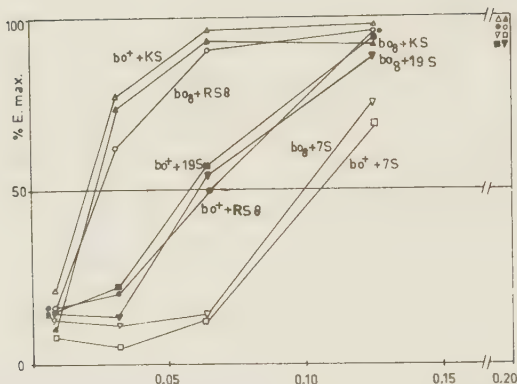


Abb. 6b: Verhalten von bo_8 und bo^+ Mahoney Stämmen am Al.hydr.-Gel System. Der resistente Stamm wird nicht am Inhibitor gebunden ($\circ-\circ$) aber bindet sich am 19 S ($\nabla-\nabla$) und 7 S Immunantikörper ($\nabla-\nabla$). Der empfindliche Stamm wird am Inhibitor gebunden ($\bullet-\bullet$), sowie am 19 S ($\blacksquare-\blacksquare$) und 7 S Immunantikörper ($\square-\square$). Kontrolle: Elution beider Stämme in Gegenwart von Kälberserum ($\blacktriangle-\blacktriangle$) ($\triangle-\triangle$).

Ausserdem geht aus der Abbildung hervor, dass sowohl das resistente als auch das sensible Virus weiterhin an 19 S und 7 S - typenspezifischem Kaninchen-Immunglobulin gebunden werden, ein Verhalten, das der Neutralisation der Infektiosität beider Mutanten in der Gewebekultur entspricht.

4. Charakterisierung des Inhibitors

Die inhibitorischen Stoffe der Rinderseren wurden im folgenden näher charakterisiert. Die Titrationsen der

Aktivität wurden nunmehr aus Genauigkeitsgründen ausschliesslich in-vitro durchgeführt. Die Fraktionierung an DEAE-Zellulose (Abb. 5) und das Verhalten im Aluminiumhydroxyd-Gel-System (Abb. 2) liefern einen ersten Hinweis, daß der Inhibitor zur Klasse der Makroglobuline gehört. Die Untersuchung des Sedimentationsverhaltens des Inhibitors im Saccharosegradienten, unterstützt diese Auffassung.

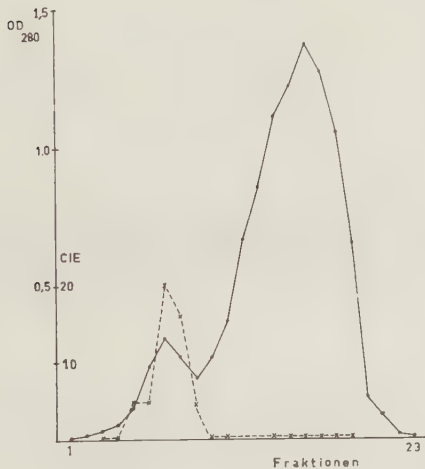


Abb. 7: Sedimentationsverhalten der Inhibitoraktivität im Saccharosegradienten (8 Stunden 38.000 U.p.M., Rotor Spinco S W 39, Saccharosekonzentrationen 10 - 40%). (●—●—●) optische Dichte bei 280 mμ. (x---x) Titer im Al.hydr.-Gel System. Die Aktivität des Serums liegt ausschliesslich in der schweren Fraktion.

In der Gel-Filtration mit Sephadex G-200 verhält sich die inhibitorische Substanz ebenfalls wie 19 S-Makromoleküle des Serums.

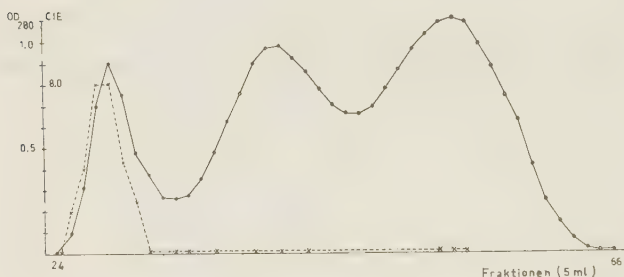


Abb. 8: Trennung eines Rinderserums durch Gel-Filtration an Sephadex G-200. Optische Dichte bei 280 mμ (●—●), inhibitorische Aktivität des Serums gegen Poliovirus im Al.hydr.-Gel System (x---x).

2-Mercapto-Äthanol inaktiviert die Aktivität von 19 S-Globulinen, wenn auch nicht ausschliesslich, so daß diesem Test allein keine Beweiskraft zukommt. Die Inhibitoraktivität in den Rinderseren konnte nach Inkubation mit 2-Mercapto-Äthanol komplett inaktiviert werden (Tabelle 1). 2 ml 1/3 verdünntes Rinderserum werden mit 2 ml 2-Mercapto-Äthanol (0,4 M) gemischt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Davon werden 0,2 ml mit 0,2 ml ³²P-markiertem Virus versetzt und bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Weiter hinzugefügt werden 2 ml Phosphat/Trispuffer 0,04 M, 1,6 ml Hanks/Trispuffer und 1 ml Al.hydr.-

Gel. Nach 10 Minuten bei Zimmertemperatur wird das Röhrchen zentrifugiert und der Überstand auf Radioaktivität gemessen (Röhrchen A). Als Kontrolle werden folgende Mischungen eingesetzt und gleich behandelt: Röhrchen B: 2 ml Rinderserum mit 2 ml Hanks/Trispuffer; Röhrchen C: 2 ml Hanks/Trispuffer mit 2 ml 2-Mercapto-Äthanol (0,4 M); Röhrchen D: 2 ml Kälberserum mit 2 ml 2-Mercapto-Äthanol (0,4 M). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefasst worden.

Tabelle 1

Wirkung von 2-Mercapto-Äthanol auf inhibitorisches Rinderserum (siehe Text).

Röhrchen A	Röhrchen B	Röhrchen C	Röhrchen D
786* (100%)	93 (12%)	786 (100%)	726 (94%)

* Imp/Min.

Nach 24 Stunden Einwirkungszeit wurde der Inhibitor zerstört. Im Röhrchen A erscheint das Virus nach Zentrifugation des Aluminiumhydroxyd-Gels im Überstand, Bei der Kontrolle B blieb der Virus-Inhibitor-Komplex am Al.hydr.-Gel gebunden. In der Kontrolle C wird geprüft, ob das 2-Mercapto-Äthanol eine Wirkung gegen die Adsorption des Virus am Al.hydr.-Gel hätte, und bei D wird das Virus vom Gel in Gegenwart des nicht inhibitorischen Kälberserums und von 2-Mercapto-Äthanol eluiert.

5. Untersuchungen über die Bindung zwischen Virus und Inhibitor

Die Inhibitoren verhalten sich nicht nur an DEAE-Zellulose, bei der Gel-Filtration, bei der Sedimentation und gegenüber 2-Mercapto-Äthanol wie 19 S Makroglobulin, sondern auch in Bindungseigenschaften gegenüber Polioviren. Mit Hilfe des Adsorptionstestes wurde die pH-Labilität des Komplexes Virus-Inhibitor im Vergleich mit entsprechenden Komplexen von Virus-19 S,-7 S Immunantikörpern von Kaninchen untersucht. ^{32}P -markiertes Poliovirus wurde mit Rinderserum oder mit Kaninchenserum, das typenspezifische 19 S oder 7 S Immunantikörper enthielt, vermischt, inkubiert und nach Behandlung mit verschiedenen sauren Puffern im Geladsorptionstest untersucht.

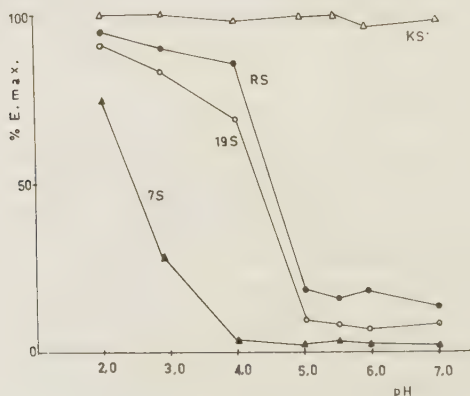


Abb. 9: Dissoziierung des Komplexes Virus-Inhibitor (●—●), Virus-19 S (○—○) und Virus-7 S Immunantikörper (▲—▲) durch Einwirkung des pH. Virus-Kälberserumkontrolle (△—△). Angewandte Pufferlösungen: Glycinpuffer 0,1 M (pH 2,0 und 3,0), Acetatpuffer 0,2 M (pH 4,0, 5,0 und 5,5), Phosphatpuffer 0,05 M (pH 5,9) und Hanks/Trispuffer (pH 7,0).

Zwischen pH 4,0 und pH 5,0 löst sich die Bindung zwischen Virus und Inhibitor bzw. 19 S Immunantikörper, so daß das Virus bei den angewandten Phosphatkonzentrationen wie in der Kontrolle eluiert wird. 7 S Antikörper werden erst bei niedrigen pH-Werten dissoziiert. 19 S Immunantikörper und Inhibitor verhalten sich demnach auch hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Bindung mit dem Virus gleich.

Neutralisationskinetik und Untersuchung der Reaktionsprodukte von Virus und inhibitorhaltigem Serum machen es wahrscheinlich, daß sensibles Virus den Inhibitor in-vitro bindet, resistentes Virus dagegen nicht. Um diesen Tatbestand noch besser abzusichern, wurde ^{32}P -markiertes Virus nach Inkubation mit inhibitorhaltigem Serum im Coombstest mit Anti-Rinderglobulin von Kaninchen präzipitiert. Das für die Immunisierung des Kaninchens benutzte Serum enthielt keinen spezifischen Inhibitor gegen das Virus.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt

Tabelle 2

Präzipitation von Mahoney bo^+ und bo_8 nach Inkubation mit Rinder Serum Nr. 8 und Kälberserum im Coombstest mit Anti-Rinderglobulin-Kaninchen-antisera.

	$\text{bo}_8 + \text{KS}$	$\text{bo}_8 + \text{RS8}$	$\text{bo}^+ + \text{KS}$	$\text{bo}^+ + \text{RS8}$
+ ARS	725*	650	365	63
+ KS	625	625	335	310

* Imp/Min.

KS = Kälberserum

ARS = Anti-Rinderglobulin-serum RS8 = Rinder Serum Nr. 8

Inhibitorsensibles Virus bo^+ wurde in diesem Test präzipitiert, wenn es zuvor mit Inhibitor inkubiert wurde. Es konnte keine Präzipitation nachgewiesen werden, wenn bo^+ mit Kälberserum und bo_8 mit Rinderserum zuvor inkubiert wurden. Der Versuch beweist demnach, daß der Inhibitor an sensibles Virus gebunden wird. Ausserdem besitzt er höchstwahrscheinlich ein Rinderglobulin-spezifisches Antigen.

In Abb. 6a wurde gezeigt, daß ein gewisser Anteil der Infektiosität durch den Inhibitor nicht neutralisiert wurde. Diese Restaktivität von etwa 10 % der Ausgangsinfektiosität blieb gleich hoch, auch wenn die Serumkonzentration erhöht wurde.

Um die Natur dieser Restinfektiosität zu klären, wurde untersucht, ob diese Virus-Fraktion den Inhibitor in-vitro binden kann oder nicht. ^{32}P -markiertes Virus wurde mit Rinderseruminhibitor inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Gemisch 1/10 verdünnt, an Al.hydr. chromatographiert. Radioaktivität und Infektiosität wurden in den Eluatn bestimmt.

Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

Es zeigt, daß die Restinfektiosität sich chromatographisch wie Virus-Inhibitor-Komplex verhält, das heisst, daß sie primär an den Inhibitor gebunden ist und diese Bindung sekundär im Infektiositätstestsystem dissoziiert wird, oder aber, daß trotz Bindung des Inhibitors dieses

Virus infektiös bleibt.

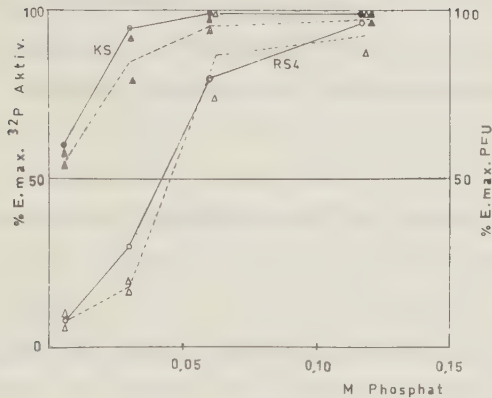


Abb. 10: Titration der Infektiosität in Gemischen von ^{32}P -markiertem Poliovirus (Mahoney) und inhibitorhaltigem Rinderserum (Nr. 4) bzw. inhibitorfreiem Kälberserum nach Chromatographie an Aluminiumhydroxyd-Gel.
 E.max. (Gemisch mit Inhibitor): $4,6 \times 10^7$ PFU/ml;
 E.max. (inhibitorfreie Kontrolle): $4,6 \times 10^6$ PFU/ml.
 (○—○) und (●—●): Elutionskurven, (Δ---Δ) und (▲-----▲): Infektiositätskurven.

Es ist unwahrscheinlich, daß die Dissoziation in diesem Fall ein Verdünnungseffekt ist, denn die Untersuchung eines vor der Chromatographie 1/100 verdünnten und 1 - 2 Stunden aufbewahrten Gemisches zeigt die gleiche feste Bindung, wie ein vor der Chromatographie um 1/10 verdünntes Gemisch.

Agarkomponenten im Infektionstestsystem könnten dabei eine dissoziierende Wirkung auf den Virus-Inhibitor-Komplex haben. Dies wurde auf folgende Art untersucht:

Agarextrakte wurden nach Agol et al. (29) vorbereitet.

Unverdünnt, 1/10 und 1/40 verdünnt, wurde das Präparat zu gleichen Teilen mit einem vorher schon 1 Stunde bei 37°C inkubierten Virus-Inhibitorgemisch zusammengegeben und bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Die Restinfektiosität wurde im Plaquetest titriert, wobei der im Testsystem verwendete Agar vorher sorgfältig gewaschen wurde. Es konnten keine Unterschiede gegenüber einer Kontrolle, die keinen Agarextrakt enthielt, beobachtet werden. In-vitro scheint demnach Agarextrakt, der zahlreiche sulfatierte Polysaccharide enthält, keine dissoziierende Wirkung zu haben.

6. Unterschiedliche Spezifität von Rinderserum-inhibitoren

Pagano et al. (18) zeigten, daß es Rinderseren gibt, die nur gegen Stamm CHAT, Typ 1, ein attenuiertes Virus, inhibierend wirksam sind, nicht jedoch z.B. gegen Stamm Mahoney.

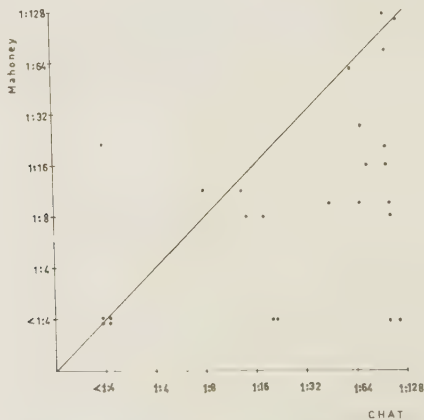


Abb. 11: Vergleich der Titer im Al.hydr.-Gel System von 20 Rinderseren gegen die Stämme Mahoney und CHAT von Poliovirus.

In Abbildung 11 ist dargestellt, daß von 26 untersuchten Rinderseren 4 Seren keine Inhibitoraktivität haben, 4 das Verhalten der von Pagano beschriebenen Rinderseren zeigten, eins nur gegen Stamm Mahoney und nicht gegen CHAT und schliesslich, daß eine Reihe von Seren mit gleichem oder unterschiedlichen Titer gegen beide Virusstämme wirksam sind.

Die unterschiedliche Wirksamkeit von Rinderseren gegen beide Virusstämme dürfte auf verschiedene Spezifitäten der Bindungsstellen für Inhibitoren an der Virusoberfläche zurückzuführen sein. Es ergibt sich andererseits die Frage, ob diesen spezifischen Bindungsstellen in den inhibitorischen Seren mit Aktivitäten gegen beide Virusstämme spezifische Inhibitoren entsprechen, mit anderen Worten, ob es Gemische verschiedenspezifischer Inhibitoren sind oder ob diese Seren Inhibitoren enthalten, die z.B. zwei Spezifitäten pro Molekül tragen können. Aus diesem Grunde wurde ein Absorptionsversuch eines Serums Nr. 8 durchgeführt. Dieses Serum ist gegen CHAT und Mahoney in gleichem Titer wirksam. Absorbiert man dieses Serum mit CHAT, so bleibt, wie Abbildung 12 zeigt, der Titer gegen Stamm Mahoney praktisch unverändert erhalten, absorbiert man umgekehrt mit Mahoney, so bleibt der Titer gegen CHAT unverändert.

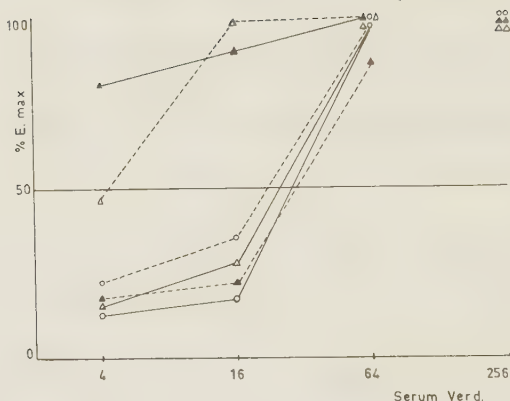


Abb. 12: Absorptionsversuch mit einem aktiven Rinder-serum gegen die Stämme Mahoney und CHAT. Titration des Serums im Al.hydr.-Gel System. Phosphat-konzentration 0,016 M. (o-----o) und (o-----o) Titer nicht behandelten Serums gegen Mahoney und CHAT. (Δ-----Δ) und (Δ-----Δ) zeigen die Titer des Serums nach Absorption mit dem Stamm CHAT, gegen CHAT und gegen Mahoney. (▲-----▲) und (▲-----▲) zeigen die Titer des Serums nach Absorption mit Stamm Mahoney gegen die Stämme CHAT und Mahoney.

Aus dem Versuch geht hervor, daß das Serum Nr. 8 ein Gemisch von Inhibitoren mit je verschiedener Spezifität enthält. Ausserdem geht aus dem Versuch hervor, daß hinsichtlich der in diesem Serum vorkommenden Spezifitäten Stamm Mahoney und Stamm CHAT keine gleichartigen Bindungsstellen besitzen.

Aus einer Population Mahoneyvirus konnte gegen Serum Nr. 8 eine resistente Mutante gezüchtet werden, die gegen

andere Anti-Mahoney wirksame Rinderseren sensibel blieb. Gleiches gilt für eine resistente Mutante des Stammes

CHAT. Aus diesen Befunden kann man bislang lediglich den Schluss ziehen, daß die gegen Mahoney wirksamen Inhibitoren in sich hinsichtlich ihrer Spezifität nicht homogen sind, so daß man mit mehreren spezifischen Bindungsstellen am Viruspartikel rechnen muss.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Von den verschiedenen in der Literatur erwähnten Inhibitoren auf die Vermehrung von Polioviren (siehe Einleitung) sind die von Takemori et al. (10) erstmals näher beschriebenen Inhibitoren in Rinderseren am besten untersucht worden. Die Möglichkeit, mit diesen Rinderseren Neutralisationen des Poliovirus unter den Versuchsbedingungen einer Bestimmung der Neutralisationskinetik durchführen zu können, lässt darauf schliessen, dass zumindest eine Bedingung des Inhibitionsvorganges die Bindung des inhibitorisch wirksamen Stoffes an das Viruspartikel ist, vergleichbar der neutralisierenden Wirkung eines neutralisierenden Antikörpers. Diese Befunde wurden von Pagano et al. (9) bestätigt und erweitert. Die Autoren konnten zeigen, daß die inhibitorische Aktivität der Rinderseren auf Grund des Verhaltens bei einer Filtration von Sephadex G-200 in die Makroglobulinfraktion der Seren lokalisiert werden kann. Ausserdem konnte die Aktivität bei Fällungsreaktionen in der Globulinfraktion nachgewiesen werden.

Befunde dieser Art legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den in Rinderseren nachweisbaren Inhibitoren um

Antikörper vom Makroglobulintyp handelt, die man oft auch als natürliche Antikörper bezeichnet. Man versucht damit auszudrücken, dass über ihre Entstehung, insbesondere über das ihre Spezifität prägende Antigen nichts bekannt ist. Solche natürlichen Antikörper kennt man z.B. beim Kaninchen. Sie unterscheiden sich praktisch in ihrem Reaktionsvermögen und in ihren stofflichen Qualitäten nicht von einem 19 S-Makroglobulinantikörper, den man erhält, wenn man Kaninchen mit einer geringen Dosis Poliovirus immunisiert und wenige Tage später Serum entnimmt (22).

Rinderseruminhibitoren haben nun eine zusätzliche Besonderheit, die sie von Makroglobulinantikörpern bislang unterscheidet: Es lassen sich Poliovirusmutanten selektieren, die gegen die Wirkung eines bestimmten Rinder-serums resistent sind. Ausserdem gibt es auch natürliche Virusstämme, die gegen die Wirkung eines bestimmten Rinder-serums resistent sind. Dieser Tatbestand ist insofern von großem Interesse, als man mit diesen Mutanten virusstamm-spezifische Merkmale in die Hand bekommt, die für genetische Untersuchungen verwendet werden können, z.B. für Rekombinationsversuche (16) oder für diagnostische Identifizierungsfragen (18).

Für die Bearbeitung solcher Fragen ist das übliche Untersuchungssystem, nämlich die Bestimmung der Restinfektiosität im Rahmen eines Neutralisationsversuches in Gewebekulturen aus verschiedenen Gründen nicht durchweg gut geeignet.

1. Üblicherweise ist es notwendig, nach einer bestimmten Einwirkungszeit, die Beimpfung des Virus-Serum-Gemisches auf ein Zellsystem durchzuführen und die Reaktion durch Bestimmung der Restinfektiosität zu testen. Das benutzte Zellsystem kann dabei den Reaktionsausfall erheblich beeinflussen; z.B. fallen Untersuchungen über die Resistenz einer Virusmutante ganz unterschiedlich aus, je nachdem sie in Gegenwart des Serums im Plaquetest oder durch Bestimmung der Neutralisationskinetik untersucht werden (9).

2. Bei der Untersuchung von Rekombinanten und Serumtitern im Plaquetest fällt störend ins Gewicht, daß ein relativ hoher Anteil des empfindlichen Virus trotz Anwesenheit des Serums Plaques bildet, die nicht von resistenten Viren gebildet werden (wie aus Untersuchungen der Abimpfungen hervorgeht) und deren Anteil auch bei Erhöhung der Serumkonzentration nicht geringer wird.

3. Es scheint multiple Resistenz gegen verschiedene Rinderseruminhibitoren zu geben und entsprechend möglicherweise Molekülspezies mit spezifischer inhibitorischer Wirksamkeit. Die Existenz solcher monospezifischer Inhibitoren kann nur in Absorptionsversuchen getestet werden, am besten mit nativem, nicht inaktiviertem Virus. Die Auswertung der Restaktivität eines mit infektiösem Virus absorbierten Serums mit dem auf Infektiositätsmessungen beruhenden Neutralisationstest bereitet erfahrungsgemäß Schwierigkeiten.

Aus den angeführten Gründen wäre es deshalb von Vorteil, wenn für die Untersuchung der Virus-Inhibitor Wechsel-

wirkung ein in-vitro Testsystem zur Verfügung stehen würde, das eine klare Beurteilung der Bindungsreaktion zwischen Virus und Inhibitor ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, dafür ein chromatographisches Verfahren anzugeben. Es erlaubt, die Bindung zwischen Virus und Inhibitor zu untersuchen. Es ermöglicht einfach durchführbare Titrationsen der inhibitorischen Aktivität und damit eine genaue stoffliche Charakterisierung des Inhibitors in Rinderseren. Schliesslich ist es möglich, mit Hilfe dieses Testsystems die Natur der nach Inkubation mit hochkonzentriertem inhibitorischen Serum nachweisbaren Restinfektiosität zu untersuchen und nachzuweisen, dass auch sie primär an Inhibitor gebunden wird. Mit Hilfe des Testsystems können ausserdem inhibitorhaltige Seren mit nativem Virus absorbiert und mit radioaktiv markiertem Indikatorvirus auf Restaktivität untersucht werden.

Ausgangspunkt der Arbeit ist ein Versuchssystem, das ursprünglich für die Bestimmung von Virus-Antikörper-Reaktionen in-vitro entwickelt wurde (26). Es beruht auf dem Prinzip, dass Virus-Antikörper-Komplexe fester an Aluminiumhydroxyd-Gel gebunden werden, als freies Virus. Die Bindung wird dabei praktisch ausschliesslich von den Bindungseigenschaften des Antikörpers determiniert, wenn das Viruspartikel mit Antikörpermolekülen abgesättigt ist (21).

Inkubiert man ^{32}P -markiertes Virus mit inhibitorhaltigem Rinderserum, wo wird dieses Virus ebenfalls fester

an das Adsorbens Aluminiumhydroxyd gebunden, als freies Virus. Es wurde zunächst bewiesen, dass das dabei wirksame Prinzip der Inhibitor selbst ist: Nach Fraktionierung an DEAE-Zellulose, bei der vergleichenden Titration verschiedener individueller Rinderseren und bei der Untersuchung des Verhaltens empfindlicher und sensibler Virusstämme ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den im Neutralisationstest und im chromatographischen Test bestimmten Aktivitäten. Ausserdem wird nachgewiesen, daß der Inhibitor an das Virus gebunden wird: Der Virus-Inhibitor-Komplex lässt sich durch Anti-Rinderglobulinserum präzipitieren.

Die stoffliche Charakterisierung bestätigt und erweitert die Befunde von Pagano et al. (9). Chromatographie an DEAE-Zellulose und an Aluminiumhydroxyd-Gel liefern Hinweise für ähnliche Oberflächeneigenschaften wie sie 19 S Makroglobuline besitzen. Das Verhalten bei der Sephadex-Gelfiltration spricht für ähnliche Grössenverhältnisse, das Verhalten bei der Sedimentation für gleiche Sedimentationskonstante und die Inaktivierbarkeit durch 2-Mercapto-Äthanol für ähnliche, das Makromolekül stabilisierende Bindungen. Ausserdem wird die Bindung an das Poliovirus bei dem gleichen pH-Wert dissoziiert, wie die eines 19 S-Frühimmunantikörpers vom Kaninchen. Man wird aus diesen Befunden mit großer Sicherheit den Schluss ziehen können, dass die inhibitorische Wirksamkeit an Moleküle vom Makroglobulintyp gebunden ist.

Unklar ist jedoch, ob die Spezifität dieser Inhibito-

ren der zugrundeliegenden Struktur nach der spezifischen Bindungsstelle eines Antikörpers entspricht oder ob andere unspezifische Bindungsstellen des Makromoleküls für die Bindung an das Virus verantwortlich sind. Zu denken ist dabei z.B. an die Polysaccharidkomponenten der 19 S Makromoleküle (ca. 12%). Manche Polysaccharide wie Dextransulfat oder auch Agarpolysaccharide haben eine inhibierende Wirkung auf das Poliovirus, die zum Teil durch eine Bindung des Polysaccharids an das Virus hervorgerufen werden dürften (30). Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß zumindest Agarpolysaccharide keine dissoziierende Wirkung auf den Virus-Inhibitor-Komplex haben. Jedoch ist damit die vorstehende Hypothese nicht ausschliessbar, insofern als der Virusstamm Mahoney ohnehin durch Agarpolysaccharide nicht gehemmt wird (29) und ausserdem könnte das Agarpolysaccharid eine solch geringe Affinität zur Virusoberfläche besitzen, dass der Virus-Inhibitor-Komplex nicht dissoziiert werden kann.

Zumindest für das Vorliegen monospezifischer Inhibitoren, mit anderen Worten für die Existenz von Inhibitoren mit unterschiedlicher Spezifität sprechen die Befunde über die Absorption von Inhibitoraktivitäten aus Rinderseren: Stamm CHAT kann durch bestimmte Rinderseren inhibiert werden, die gegen Stamm Mahoney nicht wirksam sind, umgekehrt kann Stamm Mahoney durch Rinderseren inaktiviert werden, die gegen Stamm CHAT nicht aktiv sind. Manche Seren sind gegen beide Virusstämme gleichzeitig wirksam. Absorbiert man sie mit CHAT oder Mahoney, so kann man die jeweils spezifisch wirksame Komponente heraus-

absorbieren.

Somit steht für die Deutung der Rinderseruminhibitoren als natürlich erworbene Antikörper eigentlich nur noch der Nachweis aus, daß sie auf Grund eines Kontaktes mit Antigenen erworben werden können, die mit Antigenen der Poliovirusoberfläche verwandt sind. Immunisiert man Rinder parenteral mit Poliovirus, so bilden sich neutralisierende Immunantikörper (31). Es ist bislang nicht gelungen, Rinder mit Polioviren zu infizieren und auf diese Weise eine Antikörperbildung in Gang zu setzen (32). Auch gibt es keine Untersuchungen über die parenterale Immunisierung von Rindern mit inhibitorresistentem Virus.

Die Tatsache, daß Inhibitoren vor allem bei Rinderseren und nicht in Kälberseren nachgewiesen wurden, spricht nicht unbedingt für den Erwerb der Eigenschaften, sondern könnte ein Reifungsphänomen sein. Auch darf man aus dem Befund, daß nur einige Rinderseren Inhibitoren enthalten, nicht allzuweite Schlüsse ziehen, vor allem, wenn nur mit wenigen Virusstämmen getestet wird. Das illustriert die Abb. 11, aus der hervorgeht, daß man mit dem Stamm CHAT bei sehr viel mehr Rindern Inhibitoren nachweist als mit dem Stamm Mahoney.

Inkubiert man Poliovirus mit Rinderserum, so erhält man nach Restinfektiositätsbestimmungen im Plaquetest Fraktionen, die sich auch bei Erhöhung der Serumkonzentrationen oder bei Zugabe frischen Serums nicht neutralisieren

lassen. Diese Fraktion kann die Bewertung von Rekombinationshäufigkeiten und Spontanmutationsfrequenzen ausserordentlich erschweren. Sie erschwert auch die Selektion resistenter Mutanten. Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß diese Restinfektiosität das Resultat einer komplizierten Wechselwirkung zwischen Virus, Inhibitor und möglicherweise auch des Wirtszellsystems ist. Die Befunde zeigen, daß diese nicht inhibierbare Restinfektiosität durchaus in der Lage ist, Inhibitor zu binden. Die Bindung ist im Verlaufe der in-vitro Auswertung auch nicht dissoziierbar d.h. die Bindung widersteht den Manipulationen bei der Auswertung im Adsorptionstest. Sie ist auch nicht durch Verdünnung dissoziierbar und es scheint so, dass Agarpolysaccharide im Infektiositätstestsystem keine Dissoziationsvermögen besitzen. Möglicherweise führt die Wirtszelle selbst eine Dissoziation herbei. Man könnte sich demnach vorstellen, dass die Restfraktion ein Anteil der normalen Viruspopulation ist, der schwachavide Inhibitormoleküle bindet, die durch höherwertige Inhibitormoleküle nicht dissoziiert werden und somit die Bindung stark avider Moleküle blockieren. Das Verhalten der Restinfektiosität nach Inkubation mit inhibitorhaltigen Rinderseren entspricht demnach genau den von Philipson (33) ermitteltem Verhalten der Restinfektiosität nach Inkubation des Poliovirus mit 19 S und 7 S Immunkörpern. Diese Befunde zeigen, daß es bei der Auswertung von Rekombinations- oder Mutationsfrequenzen bei Verwendung von Rinderinhibitorresistenz als genetisches Merkmal sehr darauf ankommt, die Natur der resistenten

Plaques durch Abimpfung und Nachuntersuchung abzusichern.

Aus der Population des Poliovirusstammes Mahoney, der durch ein bestimmtes Rinderserum inhibiert wird, konnte ein gegen dieses Serum resistenter Stamm selektiert werden. Dieser resistente Stamm blieb sensibel gegen eine Reihe anderer Rinderseren. Aus der Population des Poliovirusstammes CHAT, der durch ein bestimmtes Rinderserum inhibiert wird, konnte ebenfalls ein resistenter Stamm selektiert werden. Dieser blieb sensibel gegen eine Reihe weiterer Seren. Takemori et al. (10) züchteten Doppelmutanten, die gegen Rinderseren mit verschiedenspezifischen Aktivitäten wirksam waren. Aus diesen Befunden geht hervor, dass am gleichen Viruspartikel multiple spezifische Bindungsstellen für Inhibitoren vorhanden sein können. Es ergibt sich zuerst die Frage, in welcher Beziehung diese Bindungsstellen zu den Bindungsstellen für typenspezifische Antikörper stehen. Gegen ein bestimmtes Rinderserum resistente Mutanten eines Virusstammes bleiben weiterhin sensibel gegen die neutralisierende Wirkung von Immunantikörpern, sei es solche vom 19 S, sei es solche vom 7 S Typ (siehe Abb. 6b). Das deutet auf eine unterschiedlich lokalisierte Bindungsstelle hin, jedoch nicht unbedingt. Über die Struktur des typenspezifischen Antigens am Polioviruspartikel ist wenig bekannt. Es könnte sein, dass es sich aus einem Mosaik von Bausteinen zusammensetzt, die einzeln mutieren können, ohne dass bei geringer Variation der Gesamtstruktur eine Bindung typenspezifischer Antikörper ausgeschlossen ist. Rinderseruminhibitoren könnten in diesem Sinne an das Gesamtantigen

schlecht adaptierte, jedoch an einzelne Komponenten des Gesamtantigens ausserordentlich angepasste Antikörper sein, d.h. sie würden sich dann an Teilbereiche des Gesamtantigenareals binden. Es ist versucht worden, mit Rinderserum abgesättigtes Virus und dann mit 7 S Immuneserum behandeltes Virus zu chromatographieren oder im Coombs-Test mit Antirinderserumglobulin zu präzipitieren (unveröffentlicht). Solches Virus wird präzipitiert, d.h. es bindet auf jeden Fall Rinderinhibitor auch noch nach Inkubation mit 7 S-Immuneserum vom Kaninchen. Chromatographisch wird eine Verschiebung der Bindungskurven nach höheren Phosphatwerten beobachtet, ein Hinweis darauf, dass gleichzeitig neben Bindungsstellen für Inhibitor frei zugänglich, durch Anwesenheit des Inhibitors an der Oberfläche sterisch nicht behinderte Bindungsstellen für den typenspezifischen Antikörper vorhanden sein können.

Multiple Bindungsstellen am Viruspartikel, die einzeln mutieren können, sind der Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Systems von Oberflächeneigenschaften des Poliovirus, dem eventuell diagnostische Bedeutung im Rahmen der Stammdifferenzierung von Poliovirus zukommt. Im Fall des Stammes CHAT, eines attenuierten Virus, hat sich ein solcher Ansatzpunkt bereits bewährt (18).

V. Zusammenfassung

Die in einigen Rinderseren nachweisbaren Inhibitoren, die gegen die Stämme Mahoney und CHAT von Poliovirus Typ 1 wirksam sind, wurden im Gel-Adsorptionssystem mit Aluminiumhydroxyd-Gel untersucht. Der Inhibitor verhält sich wie ein 19 S Makroglobulin (IgM), wie durch Sephadex G-200 Gel-filtration, Trennung an DEAE-Zellulose und Sedimentation im Saccharosegradienten bewiesen wurde. Er wird durch Behandlung mit 2-Mercapto-Äthanol zerstört.

Der Inhibitor bindet sich an die Virusoberfläche in Abwesenheit von Zellen. Der Komplex Virus-Inhibitor kann durch Antirinderglobulinserum präzipitiert werden. Die Virus-Inhibitor Bindung wird bei dem gleichen pH-Wert dissoziiert, wie die Virus-19 S-Antikörper Bindung.

Die bei der Neutralisation von Polioviren mit Rinderserum erkennbare Restinfektiosität (ca. 10%) ist Ausdruck einer partiellen Dissoziation von primär an das Virus gebundenen Inhibitor im Wirtszellsystem.

Es wurden resistente Stämme gegen die Wirkung von spezifischem Rinderserum gezüchtet. Diese Stämme bleiben weiter empfindlich gegen die Wirkung anderer aktiver Rinderseren, 19 S- und 7 S-Immunantikörpern. Durch Adsorptionsversuche konnte die Existenz von monospezifischen Inhibitoren mit unterschiedlicher Spezifität gegen die Stämme CHAT und Mahoney gezeigt werden.

VI. Literaturverzeichnis

- 1) Flexner, S. and Lewis, P.A. (1910)
Experimental poliomyelitis in monkeys. Eighth note:
further contributions to the subjects of immunization
and serum therapy.
J. Am.Med.Assoc. 55:662
- 2) Armstrong, G. (1939)
Successful transfer of the Lansing strain of poliomyeli-
tis virus from the cotton rat to the white mouse.
Pub.Health Rep. 54:2302
- 3) Hammon, W. Mc D., Mack, W.N. and Reeves, W.C. (1947)
The significance of protection tests with the serum
of man and other animals against the Lansing strain of
poliomyelitis virus.
J. Immunol 57:285
- 4) Sabin, A.B. and Fieldsteel, A.H. (1953)
Nature of spontaneously occurring neutralizing substances
for 3 types of poliomyelitis virus in bovine sera.
Inter.Congr.Microbiol. 6th Congr. Rome 2:373
- 5) Bartell, P. and Klein, M. (1955)
Neutralizing antibody to viruses of poliomyelitis in
sera of domestic animals.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 90:597
- 6) McFerran, J.B. (1962)
A substance in sera of man and animals neutralizing a
bovine enterovirus
J. Path. Bact. 83:83
- 7) Robbins, F.C., Weller, T.H. and Enders, J.F. (1952)
Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in
tissue culture. II. The propagation of the poliomyeli-
tis viruses in Roller-tube cultures of various human
tissues.
J. Immunol., 69:673

- 8) Svehag, S. (1964)
The formation and properties of poliovirus neutralizing antibody. III Sequential changes in electrophoretic mobility of 19 and 7 S antibodies synthesized by rabbits after a single virus injection.
J. Exp. Med., 119:225
- 9) Pagano, J.S., Raymond, R.V. and Sedwick, W.D. (1965)
The specificity and interaction with poliovirus of an inhibitory bovine serum.
J. Immunol. 95:909
- 10) Takemori, N., Nomura, S. Nakano, M., Marioka, Y., Henmi, M. and Kitaoka, M. (1958)
Mutation of poliovirus to resistance to neutralizing substances in normal bovine sera.
Virology 5:30
- 11) Takemoto, K.K. and Habel, K. (1959)
Sensitivity and resistance of polioviruses to an inhibitor in certain horse sera.
Virology 9:228
- 12) Thomssen, R., Koehne-Barleben, G. and Schober, A.
Determination of equine serum inhibitors for poliovirus by the Gel-adsorption technique.
Arch. ges. Virusforsch. (im Druck)
- 13) Wenner, H.A., Menges, R.W. and Harshfield, G.S. (1954)
Sporadic bovine encephalomyelitis. 3. Reproduction of the disease with particular reference to the role of poliomyelitis viruses in experimental infections in calves.
J. Inf. Dis., 94:284
- 14) McFerran (1962)
Poliovirus-neutralising substances in cattle sera
J. Path. Bact. 83:73

- 15) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954)
Plaque formation and isolation of pure lines with
Poliomyelitis viruses
J.Exp. Med., 99:167
- 16) Hirst, G.K. (1962)
Genetic recombination with New-Castle Disease virus,
Poliovirus and Influenza.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27:303
- 17) Ledinko, N. (1963)
Genetic recombination with Poliovirus type 1. Studies
of crosses between a normal horse serum-resistant
mutant und several guanidine ~~res~~istent mutants of the
same strain.
Virology 20:107
- 18) Pagano, J.S. and Böttiger M. (1964)
Studies of the vaccine virus isolated during a trial
with an attenuated poliovirus vaccine prepared in a
human diploid cell strain, including use of a strain
specific bovine serum inhibitor.
Arch. ges. Virusforsch. 15:19
- 19) Youngner, J.S. (1954)
Monolayer tissue culture I. Preparation and standardi-
zation of suspensions of trypsin dispersed monkey kidney
cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85:202
- 20) Levintow, L. and Darnell, J.E. (1960)
A simplified procedure for purification of large amounts
of poliovirus: Characteristics and amino-acid analyses
of type 1 poliovirus.
J. Biol. Chem. 235:70
- 21) Thomassen R. (1963)
Chromatographische Identifizierung und Antikörperbe-

stimmung bei Polioviren
Habilitationsschrift Freiburg i.Br.

22) Svehag, S. (1964)

The formation and properties of poliovirus-neutralizing antibody. IV. Normal antibody and early immune antibody of rabbit origin. A comparison of biological and physicochemical properties.
J. Exp. Med. 119:517

23) Fahey, J.L. and Horbett, A.P. (1959)

Human gamma-globulin fractionation on anion exchange cellulose columns.
J. Biol. Chem. 234:2645

24) Dulbecco, R., Vogt, M. and Strickland, A.G.R. (1956)

A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, Western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus
Virology 2:162

25) Gard, S (1957)

Immune-inactivation of polioviruses
Arch. ges. Virusforsch. 7:449

26) Thomssen, R. (1963)

Ein chromatographisches Verfahren zur Bestimmung typenspezifischer Poliovirus-Antikörper mit ³²P-markiertem Poliovirus.
Z. Naturforsch. 18:798

27) Gerloff, R.K., Hoyer, B.G. and McLaren, L.C. (1962)

Precipitation of radiolabeled poliovirus with specific antibody and antiglobulin
J. Immunol. 89:559

28) Mandel, B. (1961)

Reversibility of the reaction between poliovirus and neutralizing antibodies of rabbit origin.
Virology 14:316

- 29) Agol, V.I. and Chumakova, M. Ya. (1962)
An agar polysaccharide and a marker of poliovirus
Virology 17:221
- 30) Bengtsson, S. and Philipson, L. (1963)
Countercurrent distribution of polioviruses
type 1.
Virology 20:176
- 31) Hampil, B., Melnick, S.L., Wallis, G. Brown, R.W., Braye, E.T.
Adams, R.R. Jr. (1965)
Preparation of antiserum to enteroviruses in large
animals
J. Immunol. 95:895
- 32) Klein M. (1958)
The significance of human antiviral neutralizing sub-
stances in animal sera.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 70:362
- 33) Philipson, L., Killander, J. and Albertson, P. (1966)
Interaction between Poliovirus and Immunglobulins.
I. Detection of viral antibodies by partition in
Aqueous Polymer Phase Systems.
Virology 28:22

Herrn Professor Dr. R. Rott und Herrn Priv. Doz.

Dr. R. Thomssen bin ich für die Unterstützung und die jederzeit gewährte Hilfe zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 11. Mai 1936 wurde ich, Hermann Gonçalves Schatzmayr, als Sohn des Otto Schatzmayr und dessen Ehefrau Zulmira Gonçalves Schatzmayr in Rio de Janeiro/Brasilien geboren.

Von 1943 bis 1946 besuchte ich die Volksschule und ab 1947 das Gymnasium Sao José, an dem ich im Jahre 1953 die Reifeprüfung ablegte.

Von April 1954 bis Dezember 1957 studierte ich Veterinärmedizin an der Universität von Rio de Janeiro und schloß das Studium mit der Gesamtnote "sehr gut" ab.

Von Dezember 1957 bis Dezember 1958 besuchte ich den Spezialisierungskursus für Mikrobiologie und Immunologie am Mikrobiologischen Institut der Universität Rio de Janeiro, wo ich anschließend als wiss. Assistent bis April 1960 gearbeitet habe.

Von Mai 1960 bis Mai 1961 war ich als Stipendiat in der Virusabteilung des Hygiene-Institutes der Universität Wien (Prof. Dr. H. Moritsch) tätig.

Von Juni 1961 bis November 1965 war ich als wiss. Assistent am Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, tätig, wo ich hauptsächlich in der Virus-Diagnostik gearbeitet habe.

Seit Dezember 1965 bin ich als Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung in Deutschland, um am Hygiene-Institut der Universität Freiburg (Prof. Dr. R. Haas), in Verbindung mit dem Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität in Gießen (Prof. Dr. R. Rott) meine Doktorarbeit durchzuführen.

FOTO-DRUCK

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gießen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546